

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung



Aktenzeichen:

103 04 448.5

Anmeldetag:

04. Februar 2003

Anmelder/Inhaber:

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim/DE

Bezeichnung:


Fluorimetrische Bestimmung von Analyten durch
Amin-N-Oxide als Redoxindikatoren

IPC:

G 01 N 31/22



Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.



München, den 10. Dezember 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Fluorimetrische Bestimmung von Analyten durch Amin-N-Oxid als Redoxindikatoren

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Reagenzienkits zur fluorimetrischen Bestimmung von Analyten.

10 Es existieren zahlreiche Möglichkeiten zur Bestimmung von Analyten, beispielsweise für diagnostische Anwendungen. Eine Möglichkeit besteht darin, den Analyten über eine Redoxreaktion und einen Redoxindikator zu bestimmen. Hierbei wirkt ein oxidierendes oder reduzierendes System direkt oder über einen Mediator auf den Redoxindikator ein. Die Anwesenheit des
15 Analyten führt zu einer Reduktion oder Oxidation des Redoxindikators, wodurch eine qualitative oder quantitative Bestimmung erfolgen kann.

Je nach Art des verwendeten Redoxindikators kann die Bestimmung des Indikators durch ein colorimetrisches, fluorimetrisches oder
20 elektrochemisches Nachweisverfahren erfolgen. Beispiele für colorimetrische Nachweisreagenzien sind Heteropolysäuren (EP-B-O 431 456), Tetrazoliumverbindungen (EP-B-O 574 769), nitrosoaromatische Verbindungen (EP-A-O 620 283()), RIND-Verbindungen (EP-B-O 190 740), Phenazine (WO 93/06487) und Indanthrone (EP-B-O 831 327). Beispiele für
25 elektrochemische Nachweisreagenzien sind Nitrosoaromaten, Phenazine, Kaliumhexacyanoferrat und Benzochinone (vgl. z.B. EP-A-O 441 222 und EP-A-O 505 494). Beispiele für fluorimetrische Nachweisreagenzien sind z.B. Resazurin (US 5,912,139), Übergangsmetallkomplexe (Ryabov et al., JBIC 4 (1999) 175-182; Woltman et al., Anal Chem. 71 (1999)
30 1504-1512) sowie Scopoletin, Esculetin, p-Hydroxyphenyllessigsäure, Di-chlorofluorescein, N-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin, und MNBDH, die ausschließlich zum H₂O₂-Nachweis Verwendung finden (siehe auch R.

Haughland, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Ed. 1996).

Die aus dem Stand der Technik bekannten fluorimetrischen Nachweisreagenzien weisen jedoch einige Nachteile auf. So erfordern die meisten bekannten Fluoreszenzindikatoren die Bestimmung von Metaboliten, wie z.B. Glucose über den Nachweis von mit Glucose-Oxidase generiertem H_2O_2 . Diese Reaktion erfordert meist noch die katalytische Unterstützung des Enzyms Peroxidase und wird stark durch Elektronendonoren, wie z.B. Harnsäure oder Billirubin, gestört. Auch sind die Reagenzien nicht über längere Zeiträume stabil.

Von Vorteil sind dagegen Redoxindikatoren, die einen von Sauerstoff unabhängigen Nachweis von Glucose erlauben, d.h. die anstelle von Sauerstoff direkt ein Elektron von einem oxidierenden Enzym empfangen. Als geeignete Elektronen-Akzeptoren sind dafür allerdings nur Resazurin und Os- oder Ru-Komplexe bekannt. Bei Resazurin überlappt jedoch die Emissionsbande des durch die Redoxreaktion gebildeten Resorufins stark mit der Absorptionsbande des nicht umgesetzten Resazurins, was zu einer deutlichen Verringerung der Empfindlichkeit der Analytbestimmung führt. Die Übergangsmetallkomplexe werden aufgrund ihres hohen Redoxpotentials (z.B. Ru-Komplexe) stark von Verbindungen, wie Ascorbinsäure, gestört. Auch variiert ihre Fluoreszenzeffizienz mit dem Sauerstoffgehalt der Probe.

Des Weiteren ist bei den bisher bekannten Fluoreszenzindikatoren die Verwendung von Anregungslichtquellen vor allem auf den UV und grünen Bereich des Lichtes limitiert. So sind z.B. nur unzureichende Verbindungen bekannt, die die Verwendung der besonders starken blauen und roten LEDs erlaubt.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand somit darin, neue redoxaktive Verbindungen als Nachweisreagenzien für die fluorimetrische Bestimmung von Analyten bereitzustellen, mit denen die Nachteile des Standes der Technik zumindest teilweise beseitigt werden können.

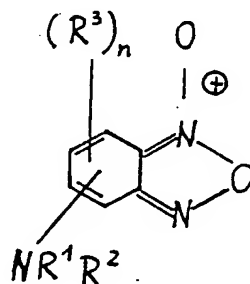
5

Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe besteht darin, als Redoxindikatoren das N-Oxid von NBD-Amin oder Derivaten davon bereitzustellen. Das durch Reduktion entstehende NBD-Amin zeichnet sich durch eine hohe Fluoreszenz aus und ist sehr gut mit blauer Lichtstrahlung anregbar.

10

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung ist somit ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten durch eine Redoxreaktion und eine fluorimetrische Bestimmung, dadurch gekennzeichnet, dass man eine den Analyten enthaltende Probe mit einem Nachweisreagenz inkontakt bringt, das als fluorimetrischen Redoxindikator eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält:

20



(I)

25

worin R^1 und R^2 jeweils unabhängig ausgewählt werden aus R , $(CH_2CH_2O)_mR$, COR , $COOR$ und $OCOR$,
 R^3 jeweils unabhängig ausgewählt wird aus NO_2 , CN , R , OR , $OCOR$, $COOR$, SR und Halogen,

30

R H oder C₁-C₄-Alkyl ist, wobei Alkyl gegebenenfalls mit Halogen, OR, SR, NR₂, COOR, CONR₂, SO₃R und Salzen hiervon oder/und PO(OR)₃ und Salzen hiervon substituiert ist, m eine ganze Zahl von 1-20, vorzugsweise von 1-10 ist und n 1, 2 oder 3 ist.

5

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Reagenz zum Nachweis eines Analyten durch eine Redoxreaktion und eine fluorimetrische Bestimmung, das als fluorimetrischen Redoxindikator eine Verbindung der allgemeinen Formel (I), wie zuvor beschrieben, enthält.

10

Die vorliegende Erfindung eignet sich um Nachweis beliebiger Analyten, die durch eine Redoxreaktion bestimmt werden können. Der Nachweis kann qualitativ, semi-quantitativ oder quantitativ erfolgen. In einer Ausführungsform der Erfindung kann der Analyt eine reduzierbare oder oxidierbare Substanz sein, beispielsweise ein in einer Körperflüssigkeit, wie etwa Blut, Serum, Plasma, Urin etc., vorhandener Metabolit. In diesem Fall verwendet man zweckmäßigerweise ein Nachweisreagenz, das neben dem Redoxindikator weiterhin ein oder mehrere Enzyme zur Reduktion oder Oxidation des Analyten sowie gegebenenfalls Coenzyme, wie Nicotinnucleosid-Derivate, z.B. NAD⁺, NADP⁺, oder Flavinnucleosid-Derivate, z.B. FAD, enthält. Bevorzugte Beispiele für derartige Analyten sind Glucose, Lactat, Alkohol, Galactose, Cholesterin, Fructose, Glycerin, Pyruvat, Creatinin, Alanin, Phenylalanin, Leucin, Triglyceride, HDL-Cholesterin. Der Nachweis von Glucose kann beispielsweise nach bekannten Verfahren mit Glucose-Oxidase (GOD), Glucose-Dye-Oxidoreductase (GlucDOR) oder Glucose-Dehydrogenase (GDH)/Diaphorase erfolgen.

25

Darüber hinaus kann der Analyt jedoch auch ein eine Redoxreaktion katalysierendes Enzym sein, beispielsweise eine Oxidoreduktase, wie etwa Glucoseoxidase, Glucose-Dye-Oxidoreductase, Dehydrogenasen oder ein

30

Enzym, dessen Reaktion an eine Oxidoreduktase-Reaktion gekoppelt werden kann.

5 Neben dem Redoxindikator und - sofern erforderlich - einem Enzym zur Reduktion der Oxidation des Analyten kann das Nachweisreagenz weitere übliche Bestandteile, wie etwa Coenzyme, Hilfssubstanzen, Puffer und gegebenenfalls Mediatoren, enthalten. Als Mediatoren sind Substanzen geeignet, welche die Elektronenaufnahme des Redoxindikators (I) unterstützen. Generell sind jedoch solche Redoxindikatoren bevorzugt, die
10 direkt Elektronen aufnehmen können.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt in üblichen Testformaten, beispielsweise in Trocken- und Nasstests. Bei einem Trockentest wird als Träger ein saugfähiges Material, z.B. in Form eines
15 Teststreifens, verwendet, auf dem das Nachweisreagenz in trockener Form, z.B. als Lyophilisat, aufgebracht sein kann. Flüssigtests wiederum werden in einer Flüssigphase in geeignete Reaktionsgefäßen, z.B. Küvetten, Mikrotiterplatten etc., durchgeführt, wobei das Nachweisreagenz im Reaktionsgefäß selbst oder in separaten Behältern in trockener oder
20 flüssiger Form vorgelegt werden kann.

Zur fluorimetrischen Bestimmung wird ein Anregungslicht mit einer vorbestimmten Wellenlänge auf die Probe gestrahlt und das von der Probe ausgehende Fluoreszenz-Emissionslicht, das eine unterschiedliche
25 Wellenlänge aufweist, wird nach bekannten Methoden bestimmt. Durch geeignete Variation der Substituenten R^1 , R^2 und R^3 ermöglicht die vorliegende Erfindung die Bereitstellung eines für die Bestimmung beliebiger Analyten optimierter Testformate.

30 Bei dem Redoxindikator (I) ist bevorzugt, dass zur Erhöhung der Löslichkeit eine oder mehrere hydrophile Gruppen, z.B. OH-Gruppen, COOH-Gruppen etc., vorhanden sind. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform

sind R^1 und R^2 mit OH substituierte C_{1-2} -Alkylgruppen, wie etwa Hydroxyethylgruppen oder Polyoxyethylengruppen. R^3 ist vorzugsweise NO_2 und n ist 1. Ein besonders bevorzugtes Beispiel für einen erfindungsgemäßen Redoxinitiator ist in Abbildung 1 gezeigt.

5

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Reagenz zum Nachweis eines Analyten durch eine Redoxreaktion und eine fluorimetrische Bestimmung, umfassend als Redoxindikator eine Verbindung der allgemeinen Formeln (I) wie zuvor angegeben.

10

Neben dem Redoxindikator kann das erfindungsgemäße Reagenz noch weitere Bestandteile, ausgewählt aus Enzymen, Coenzymen, Hilfsstoffen, Puffern und Mediatoren enthalten.

15

Weiterhin soll die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Abbildungen und das Beispiel erläutert werden.

Abbildung 1 zeigt das N-Oxid des NBD-Amins als Beispiel für einen erfindungsgemäßen Redoxindikator.

20

Abbildung 2 zeigt die Kinetik der NBD-Amin-N-Oxid-Reduktion in einem System zum Nachweis von Glucose bei verschiedenen Glucosekonzentrationen.

25

Beispiel: Glucosebestimmung mit einem NBD-Amin-N-Oxid als Redoxindikator

30

In einer 3 ml Fluoreszenzküvette wurden folgende Verbindungen vorgelegt (die Konzentrationsangaben beziehen sich dabei auf die Endkonzentration in der Küvette; das N-Oxid des NBD-Amins wurde gemäß P.B. Ghosh, M.W. Whitehouse, J. Med. Chem., 11, 305 -311 (1968) hergestellt):

Glucose-Dehydrogenase (GlucDH):	1,3 U/ml
Diaphorase:	1,3 U/ml
NAD ⁺ :	36,9 μ mol/l
N-Oxid des NBD-Amins:	35,4 μ mol/l

5

Durch Zugabe einer wässrigen Glucoselösung (0,1 M Phosphat Puffer, pH 7,4 mit 1 % NaCl) wurde die Reaktion gestartet. Die Kinetik der Reaktion wurde dabei bei einer Anregungswellenlänge von 470 nm und einer Emissionswellenlänge von 560 nm für verschiedene Glucosekonzentrationen aufgenommen. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 2 dargestellt.

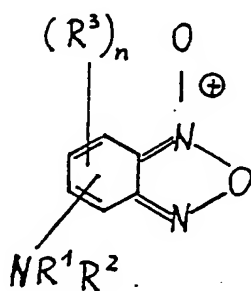
Aus Abbildung 2, in der für unterschiedliche Glucosekonzentrationen die Intensität des Fluoreszenzsignals (Intensity) in Impulsen pro Sekunde (cps) gegen die Zeit (time) in Sekunden ("sec") aufgetragen ist, ist zu erkennen, dass eine Zunahme der Fluoreszenz gefunden wird, die proportional zu der in der Probe vorhandenen Glucosekonzentration ist. Dabei entsprechen die Messkurven 1 bis 5 Glucosekonzentrationen von 0, 0.06, 1.2, 2.4, und 4 (jeweils mg/dL).

20



Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten durch eine Redoxreaktion
und eine fluorimetrische Bestimmung,
dadurch gekennzeichnet,
dass man eine den Analyten enthaltende Probe mit einem
Nachweisreagenz inkontakt bringt, das als fluorimetrischen
Redoxindikator eine Verbindung der allgemeinen Formel (I) enthält:

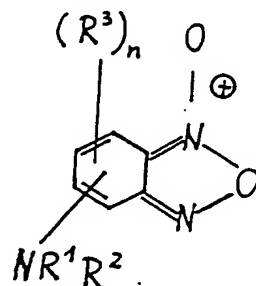


(I)

worin R^1 und R^2 jeweils unabhängig ausgewählt werden aus R , $(CH_2CH_2O)_mR$, COR , $COOR$ und $OCOR$,
 R^3 jeweils unabhängig ausgewählt wird aus NO_2 , CN , R , OR , $OCOR$, $COOR$, SR und Halogen,
 R H oder C_1 - C_4 -Alkyl ist, wobei Alkyl gegebenenfalls mit Halogen, OR , SR , NR_2 , $COOR$, $CONR_2$, SO_3R und Salzen hiervon oder/und $PO(OR)_3$ und Salzen hiervon substituiert ist,
 m eine ganze Zahl von 1-20 ist und
 n 1, 2 oder 3 ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
dass R^1 und R^2 eine mit OH substituierte C_1 - C_2 -Alkylgruppe sind.
- 5 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass R^3 NO_2 ist.
- 10 4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Redoxindikator (I) direkt Elektronen aufnehmen kann.
- 15 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass der Redoxindikator (I) über einen Mediator Elektronen aufnehmen kann.
- 20 6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Analyten eine oxidierbare Substanz nachweist.
- 25 7. Verfahren nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
dass man ein Nachweisreagenz verwendet, das weiterhin ein oder mehrere Enzyme zur Reduktion oder Oxidation des Analyten und gegebenenfalls ein Coenzym enthält.
- 30 8. Verfahren nach Anspruch 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Analyten Glucose Lactat, Alkohol, Galactose, Cholesterin, Fructose, Glycerin, Pyruvat, Creatinin, Alanin, Phenylalanin, Leucin, Triglyceride oder HDL-Cholesterin nachweist.

9. Verfahren nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass man einen Nachweis von Glucose mit Glucose-Oxidase,
Glucose-Dye-Oxidoreductase oder Glucose-Dehydrogenase/
Diaphorase durchführt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Analyten ein eine Redoxreaktion katalysierendes
Enzym oder ein Enzym, dessen Reaktion an eine
Oxidoreduktase-Reaktion gekoppelt werden kann, nachweist.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
dass man als Analyten Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT),
(AST), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT), Alanin-
Amino-Transferase (ALT), Lactatdehydrogenase (LDH) oder
Creatin-Kinase (CK) nachweist.
12. Reagenz zum Nachweis eines Analyten durch eine Redoxreaktion
und eine fluorimetrische Bestimmung, umfassend als Redoxindikator
eine Verbindung der allgemeinen Formel (I):



(I)

worin R^1 und R^2 jeweils unabhängig ausgewählt werden aus R, $(CH_2CH_2O)_m$, R, COR, COOR und OCOR,

R^3 jeweils unabhängig ausgewählt wird aus NO_2 , CN, R, OR, OCOR, COOR, SR und Halogen,

5 R H oder C_1 - C_4 -Alkyl ist, wobei Alkyl gegebenenfalls mit Halogen, OR, SR, NR_2 , COOR, $CONR_2$, SO_3R und Salzen hiervon oder/und $PO(OR)_3$ und Salzen hiervon substituiert ist,

m eine ganze Zahl von 1-20 ist und

n 1, 2 oder 3 ist.

10

13. Reagenz nach Anspruch 12, umfassend weitere Bestandteile ausgewählt aus Enzymen, Coenzymen, Hilfsstoffen, Puffern und Mediatoren.

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Verfahren und Reagenzienkits zur fluorimetrischen
5 Bestimmung von Analyten.

10 ei/ANM/28966P DE-04.02.2003

Abbildung 1:

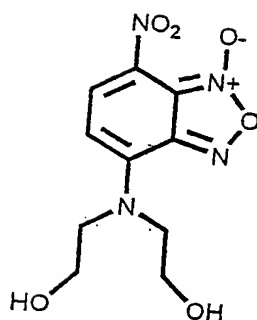


Abbildung 2:

